




Efficient liquid phase chromatography for purified organic compound

Patent number: CN1287109
Publication date: 2001-03-14
Inventor: ABEDI YALE AZMI (FR)
Applicant: ANVAT PLANT SCIENCE (FR)
Classification:
- **international:** C07B63/00; G01N30/02
- **european:** B01D15/08; G01N30/82; G01N30/90
Application number: CN20000121538 20000810
Priority number(s): US19990148153P 19990810

Also published as:

 EP1162456 (A1)
 JP2001124755 (A)
 CA2315542 (A1)

Report a data error here

Abstract not available for CN1287109

Abstract of corresponding document: **EP1162456**

An HPLC method which purifies and/or characterizes large numbers of related compounds, for example, those prepared for use in combinatorial libraries, is disclosed. The compounds are purified on a semi-preparative or preparative scale, enabling rapid preparation of combinatorial libraries with minimal operator involvement, and, preferably, with a purity greater than about 90%.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07B 63/00

G01N 30/02

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00121538.8

[43] 公开日 2001 年 3 月 14 日

[11] 公开号 CN 1287109A

[22] 申请日 2000.8.10 [21] 申请号 00121538.8

[30] 优先权

[32] 1999.8.10 [33] US [31] 60/148,153

[71] 申请人 安万特作物科学公司

地址 法国里昂

[72] 发明人 亚莱·阿兹米·阿贝迪

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
代理人 胡文宇

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 用于纯化有机化合物的高效液相色谱方法

[57] 摘要

本发明公开了一种纯化和/或鉴别大量相关化合物的 HPLC 方法,例如,被制备用于组合库的化合物。化合物的纯化在半制备或制备规模,能够在很少的操作下迅速制备组合库,并优选纯度大于大约 90%。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

WEST

权 利 要 求 书

5 1. 一种用于纯化和/或鉴别一种或多种有机化合物的方法, 包括以下步骤:

- a) 选择待纯化的化合物库,
- b) 对库中有代表性的样品进行 TLC 和/或分析 HPLC, 该样品包
- 10 c) 基于有代表性的样品如何从分析 HPLC 柱洗脱和/或样品如何在 TLC 板移动, 确定相关制备 HPLC 方法, 和
- d) 纯化库中所有或基本上所有的化合物。

其中, 如果进行分析 HPLC, 相关制备 HPLC 方法的测定是基于保留时间的 3 个或更多区之间的相互关系, 和/或如果进行 TLC, 基于保留因子的 3 个或更多区之间的相互关系, 这样, 如果有代表性的样品中
15 基本上所有的化合物落在特定区, 可以使用相关的制备 HPLC 方案来纯化落在区内的化合物。

2. 按照权利要求 1 的方法, 其中分析 HPLC 和 TLC 都在步骤 a 中进行。

20 3. 按照权利要求 1 的方法, 其中在所有或基本上所有的库被纯化前, 通过制备 HPLC 纯化有代表性的样品。

4. 按照权利要求 3 的方法, 其中有代表性的样品纯化后, 测定样品中化合物的纯度。

5. 按照权利要求 4 的方法, 其中测定纯度后, 在与步骤 a 中进行的
25 TLC 相同或基本上相同的条件下, 对 10-100%的库进行 TLC。

6. 按照权利要求 5 的方法, 其中将有代表性样品的 TLC 与 10-100%的库的 TLC 进行比较。

7. 按照权利要求 5 的方法, 其中 50-100%的库通过 TLC 进行分析。

8. 按照权利要求 6 的方法, 其中如果有代表性样品的 TLC 和 10-100%
30 的库的 TLC 表明化合物移动到同一区, 则通过制备 HPLC 对整个库进

00.08.10

行纯化。

9. 按照权利要求 6 的方法, 其中如果有代表性样品的 TLC 和 10-100% 的库的 TLC 表明化合物没有移动到同一区, 则通过应用可选方法的制备 HPLC 对整个库进行纯化。

5 10. 按照权利要求 1 的方法, 其中有代表性样品占整个库的 2-5% 之间。

11. 按照权利要求 1 的方法, 其中在库中所有或基本上所有的化合物进行制备 HPLC 中, 通过应用 UV 和/或 MS 检测器, 测定到从制备 HPLC 柱洗脱出的样品中存在所需化合物, 开始收集样品。

10 12. 按照权利要求 1 的方法, 其中所有或基本上所有通过制备 HPLC 纯化的化合物的纯度大于 90%。

13. 按照权利要求 12 的方法, 其中在进行制备 HPLC 前, 如果不能全部, 只对有代表性的样品进行分析 HPLC。

说明书

5

用于纯化有机化合物的高效液相色谱方法

本发明总的来说涉及化合物库，例如，组合和/或引导产生(Lead generation)库的纯化和/或鉴别。

10 目前，由许多常用方法用于纯化合成化合物。这些方法一般涉及从多种杂质中纯化单一目标化合物。通常，化合物在多孔板或多管排列中合成，相关化合物的数量数以千计。很难以化合物合成的速度纯化和鉴别库中的化合物。

用于纯化大量化合物的一个方法涉及色谱分析每个化合物的重复方法。它包括每个分子的合成、检测和纯化的周期过程。通常，研究纯化
15 化合物的适当纯化方法需要花费大量时间。

研究出用于纯化和/或鉴别化合物库的迅速有效方法，是非常有价值的，其可以应用于大量的有机化合物。本发明提供了这种方法。

本发明公开了用于纯化和/或鉴别化合物，特别是化合物库，如组合和/或引导产生库。本发明还公开了能够用于该方法的纯化装置。

20 该方法基于这样一个发现，即结构近似化合物，如组合和/或引导产生库中的化合物通常其在薄层色谱(TLC)板上具有大致近似的保持系数(R_f s)，在高效液相(HPLC)柱上具有大致近似的保留时间。该方法应用这一发现确定纯化近似化合物库的最佳条件。

对于给定的填充柱、溶剂系统、和流速，多数化合物倾向于在分析和/或制备 HPLC 柱上在某一时间洗脱。同样，多数化合物在 TLC 板上
25 移动某一距离。一些化合物一点也不移动($R_f=0$)，其它移动低 R_f 值(例如， $0.05 < R_f < 0.2$)，中等 R_f 值(例如， $0.2 < R_f < 0.8$)，或高 R_f 值(例如， $R_f > 0.8$)。可以很容易地测定一系列三个或更多的，优选四个或更多的 R_f s 区，或在分析 HPLCs 中，测定一系列的保留时间，其中库中化
30 合物的多数将洗脱出来(当在分析 HPLCs 中)，或移动(当在 TLC 中)，

例如,在 TLC 板上低、中、高 R_f s。这些区可以与进行制备或半制备 HPLCs 的制备或半制备方法相关。

对于给定的分析 HPLC 和/或 TLC 方案,可以鉴别一组制备 HPLC 条件,其中在一个区的化合物可以与其它区的化合物分离。因此,在化合物库有代表性的样品中,如果所有的或基本上所有的化合物存在同一区内,可以应用相同的 HPLC 方案纯化该库,其中可以很容易地与 TLC 和/或分析 HPLC 中的一个区相关。

本发明描述的方法涉及评价化合物库中化合物有代表性的样品,如组合或引导产设库,通过 TLC 和/或分析 HPLC,测定它们在 TLC 板上移动的区域,和/或在分析 HPLC 柱上洗脱时间。一旦鉴别出该区,使用相关的制备或半制备方法纯化该库。

通过给定分析 HPLC 柱、溶剂系统和流速,和/或 TLC 底板和溶剂系统,路线寻找库中有代表性的样品,可以制定出化合物库中适合的纯化条件。相关的制备或半制备 HPLC 方法可以用于纯化化合物库,而不必改变纯化参数,这样整个库可以应用单一的方法。

适合的样品数量典型为该库的 2-5%之间,依赖于库中化合物的数量。由于人们寻找适合的纯化路线,该方法在本文指“路线寻找”。

优选对化合物有代表性的样品既进行 TLC 又进行 HPLC 分析。还优选对库中的化合物样品在纯化整个库前进行制备或半制备 HPLC。它可以使人们证实适合纯化整个库的条件,例如,通过测定化合物有代表性样品中的纯度。并且,可以对库中 10-100%,优选 50-100%化合物进行 TLC 分析,将 TLC 与有代表性的样品进行比较。通过进行整个库的 TLC 分析,和/或测定化合物有代表性样品中的纯度,可以保证库中多数化合物可以进行足够的纯化。如果有代表性样品的纯度不够,或库中的 TLC 不足以与有代表性的样品进行比较,可以使用可选的制备 HPLC 条件。

如果可能,有代表性的样品应该包括库中合成的大多数极性和非极性化合物,以助于确保该方法适合于整个库。

本文描述的方法大大节约了化合物库的纯化和鉴别,可以提供化合物大于 90%的纯度。

化合物通常以组合库的形式形成，其通常以多孔板或多管排列的形式。化合物合成、纯化和评价的主要瓶颈在于确定化合物适合的纯化条件。本文描述的方法详细描述了如何纯化结构相关化合物的整个库。

该方法的发明前提是结构近似化合物，如组合和/或引导产生库中的
5 化合物。通常其在薄层色谱 (TLC) 板和高效液相 (HPLC) 柱上具有大致近似的保留时间。对于给定的吸附剂、溶剂系统、和流速，多数化合物倾向于在板上移动某一距离。例如，一些化合物一点也不移动 (R_f 接近 0)，其它移动低 R_f 值 (例如， $0.05 < R_f < 0.2$)，中等 R_f 值 (例如， $0.2 < R_f < 0.8$)，或高 R_f 值 (例如， $R_f > 0.8$)。该方法应用这项发明确定
10 纯化近似化合物库的最佳条件。

本方法的一个优点是在进行制备 HPLC 前只对有代表性的样品进行分析 HPLC。应用本文描述的方法，通过制备 HPLC 的纯化，所有或基本上所有化合物的纯度可以大于 90%。

15 定义

本文中使用的术语“制备 HPLC”及相关术语指能够制备高 (500 或更多) 微克、毫克或克大小的产品组分的 HPLC 系统。术语“制备”包括制备和半制备柱，但不包括分析柱，其提供纳克或低微克级的组分。

本文中使用的术语“机械操作”当指转换阀门时指不通过手工操作
20 选择阀门的不同位置，即通过计算机选择。实际上机械操作可以为电 (即螺线管控制阀门)，气动 (即空气压力控制阀门)，液压 (液体压力控制阀门)，或其它等价的装置。

本文中使用的术语“HPLC 相容性检测器”指适合用于 HPLC 系统的检测器，当洗脱出化合物峰后，它可以提供可检测的信号。例如，当
25 一种化合物从组分中洗脱出来，可以产生信号的检测器为 HPLC 相容的检测器。其中组分的吸收度变化较宽，可能有必要使用多个检测器。由于其不能检测出非期望的峰，能够检测出所需组分的检测器不是“不相容”的检测器。

“废液储库”指适合收集洗脱液的装置，其不包括需要的化合物，
30 例如，在需要的化合物洗脱前和洗脱后，在从柱流过或洗脱出的，用于



化合物通常以组合库的形式形成，其通常以多孔板或多管排列的形式。化合物合成、纯化和评价的主要瓶颈在于确定化合物适合的纯化条件。本文描述的方法详细描述了如何纯化结构相关化合物的整个库。

该方法的发明前提是结构近似化合物，如组合和/或引导产生库中的
5 化合物。通常其在薄层色谱 (TLC) 板和高效液相 (HPLC) 柱上具有大致近似的保留时间。对于给定的吸附剂、溶剂系统、和流速，多数化合物倾向于在板上移动某一距离。例如，一些化合物一点也不移动 (R_f 接近 0)，其它移动低 R_f 值 (例如， $0.05 < R_f < 0.2$)，中等 R_f 值 (例如， $0.2 < R_f < 0.8$)，或高 R_f 值 (例如， $R_f > 0.8$)。该方法应用这项发明确定
10 纯化近似化合物库的最佳条件。

本方法的一个优点是在进行制备 HPLC 前只对有代表性的样品进行分析 HPLC。应用本文描述的方法，通过制备 HPLC 的纯化，所有或基本上所有化合物的纯度可以大于 90%。

15 定义

本文中使用的术语“制备 HPLC”及相关术语指能够制备高 (500 或更多) 微克、毫克或克大小的产品组分的 HPLC 系统。术语“制备”包括制备和半制备柱，但不包括分析柱，其提供纳克或低微克级的组分。

本文中使用的术语“机械操作”当指转换阀门时指不通过手工操作
20 选择阀门的不同位置，即通过计算机选择。实际上机械操作可以为电 (即螺线管控制阀门)，气动 (即空气压力控制阀门)，液压 (液体压力控制阀门)，或其它等价的装置。

本文中使用的术语“HPLC 相容性检测器”指适合用于 HPLC 系统的检测器，当洗脱出化合物峰后，它可以提供可检测的信号。例如，当
25 一种化合物从组分中洗脱出来，可以产生信号的检测器为 HPLC 相容的检测器。其中组分的吸收度变化较宽，可能有必要使用多个检测器。由于其不能检测出非期望的峰，能够检测出所需组分的检测器不是“不相容”的检测器。

“废液储库”指适合收集洗脱液的装置，其不包括需要的化合物，
30 例如，在需要的化合物洗脱前和洗脱后，在从柱流过或洗脱出的，用于



再生柱的溶剂。适合的废液储库包括烧瓶、瓶子或水壶。

HPLC 装置

顶替色谱（一个 HPLC 的例子）基于样品在固定相（SP）和流动相（MP）之间平衡的原则，改变 SP 的方向。样品的单个组分像火车一样互相替换，与 SP 亲合更强的替换剂将组分的火车推出柱。气相色谱、液相色谱和 HPLC 色谱是顶替色谱中最熟知的例子。

一个 HPLC 装置典型包括至少下列部分：一个柱，填充有适合的固定相，流动相，在压力下使流动相通过柱的泵，和一个用于检测从柱中洗脱出的化合物存在的检测器。该装置可以任选包括用于提供梯度洗脱的装置，其中溶剂系统在纯化过程中变化。

用于进行 HPLC 分离的常规方法和装置是本领域公知技术，例如，如下列文献所描述：色谱杂志 (J. Chromatography), 192: 222-227 (1980), 液相色谱杂志 (J. Liquid Chromatography), 4: 661-680 (1981), 和色谱杂志 (J. Chromatography), 249: 193-198 (1982)。

适合的固定相为能从其中洗脱出所需化合的那些物质。优选的柱为反相柱，其可以为天然的（具有不同长度烷基链的硅胶）或合成的交联聚合物（由苯乙烯和二乙烯基苯组成）。固定相粒径的大小范围在几微米至几百微米之间。最优选的固定相为 C_{18} 柱。

适合的检测装置包括质谱和 UV 检测器。本文描述的方法当检测样品时，使用这两种检测器。

本文描述的方法通常需要使用相对高的压力（例如直到大约 2000 psi），依赖于泵头、柱大小、流动相和吸附剂颗粒的粒径。该压力可能超过标准制备 HPLC 的正常操作条件。该方法还通常要求使用流动相的流速（例如，超过 30 mL/min）超过标准制备 HPLC 的正常操作条件。

在一些实施方案中，甲醇/水用作流动相。甲醇/水溶剂系统比其它等价使用的系统乙腈/水（其更常用，但成本可能更高）粘度更大。增加的粘度倾向于产生高的柱压，这可能需要使用高压管，以及比正常内径更宽的管。并且，使用相对小粒径（例如，5 微米或更小）的柱填充物可以增加柱压，这进一步要求使用更宽的管。

纯化方法

该方法涉及通过 TLC 和/或分析 HPLC 测定 TLC 板移动到哪个区和/或分析 HPLC 柱洗脱到哪个区,, 评价结构近似的化合物库中有代表性的化合物样品。一旦鉴别该区后, 使用相关的制备或半制备方法纯化该库。

可以测定一系列三个或更多区的 TLC 板的保留因子和/或分析 HPLC 的保留时间, 使制备 HPLC 方案与每个区相关。该区可以为, 例如, 低、中和高 TLC 板的 R_f s, 其中低、中和高是任意的词, 其可以被定义为使它们符合于相关制备或半制备 HPLC 方案 (将一个区的化合物与其它区的化合物分离) 的任何适当的方式。对于给定的分析 HPLC 和/或 TLC 方案, 可以确定一组 HPLC 条件, 其中, 一个区的化合物可以与其它区的化合物分离。

因此, 如果 TLC 和/或分析 HPLC 表明化合物库中所有的或基本上所有的 (即, 大于 95%) 化合物存在于同一区, 它们可以应用一种相关的 HPLC 方案进行纯化。

如在本文中所使用, 有代表性的样品通常小于库的 10%, 更优选小于库的 5%, 最优选在库的 2-5% 之间。样品中化合物的数量根据库的多样性 (按照极性, 和由此得到的 HPLC 柱保留时间或 TLC 板的保留因子)。如果可能, 有代表性的样品应该包括库中合成的大多数极性和非极性化合物, 以助于确保该方法适合于整个库。

如在本文中所使用, 区指保留时间或保留因子的范围。例如, 一些化合物一点也不移动 (R_f 接近 0), 其它移动低 R_f 值 (例如, $0.05 < R_f < 0.2$), 中等 R_f 值 (例如, $0.2 < R_f < 0.8$), 或高 R_f 值 (例如, $R_f > 0.8$)。应用 TLC 和应用保留因子的这些范围, 可以鉴别出三个区, 低、中和高。该区可以与制备或半制备 HPLC 纯化化合物的条件相关, 其中化合物在 TLC 板上移动到特定的区, 具有某一 R_f 值。应用这些有代表性的区, 对一系列的化合物进行 TLC 和制备 HPLC, 结果如实施例 1 所描述。在 TLC 板上用于洗脱化合物的优选溶剂系统为 80% 甲醇/20% 水 (v/v), 在实施例 1 中使用该溶剂系统。

纯化方案优选使用四个或更多的区。考虑到应用给定溶剂系统的 TLC 板的保留因子范围,或应用给定填充柱和溶剂系统的分析 HPLC 柱上的保留时间范围,本领域技术人员可以很容易地和主观地测定一组区,并将这些区与有效制备 HPLC 条件相关,以纯化落入某个特定区的所有化合物。

应用本文描述的方法,可以迅速地确定一组可广泛应用该库的条件。当与涉及库在进行制备 HPLC 条件前对整个库进行分析 HPLC 的传统方法相比,它可以明显加快纯化该库的时间。

对于给定的分析 HPLC 柱,溶剂系统和流速,和/或给定的 TLC 板和溶剂系统,通过路线寻找库中有代表性的样品,可以制定出用于纯化化合物库的适合条件。可以应用相关的制备或半制备 HPLC 方法,纯化化合物库,而不必改变纯化参数,使在整个库可以应用单一的方法。

优选对化合物有代表性的样品既进行 TLC 又进行 HPLC 分析。还优选对库中的化合物样品在纯化整个库前进行制备或半制备 HPLC。它可以使人们证实适合纯化整个库条件,例如,通过测定化合物有代表性样品中的纯度。并且,可以进行库中 10-100%,优选 50-100%化合物的 TLC 分析,将 TLC 与有代表性的样品进行比较。通过进行整个库的 TLC 分析,和/或测定化合物有代表性样品中的纯度,可以保证库中多数化合物可以进行足够的纯化。如果有代表性样品的纯度不够,或库中的 TLC 不足以与有代表性的样品进行比较,可以使用可选的制备 HPLC 条件。

本文描述的方法大大节约了化合物库的纯化和鉴别,可以提供化合物大于 90%的纯度。

在一个实施方案中,该方法涉及进行下列步骤:

- a) 选择化合物库进行纯化,
- b) 对库中有代表性的样品进行 TLC 和/或分析 HPLC,该样品包括库中小于 10%的化合物,
- c) 基于有代表性的样品如何从分析 HPLC 柱洗脱(确定保留时间区),和/或样品如何在 TLC 板(确定保留因子区)移动,确定相关制备 HPLC 方法,和
- d) 纯化库中所有或基本上所有的化合物。

其中相关制备 HPLC 方法的测定基于保留时间 3 个或更多区之间的相关 (如果进行分析 HPLC), 和/或保留因子 3 个或更多区之间的相关 (如果进行 TLC), 这样如果有代表性的样品中基本上所有的化合物落在特定区, 可以使用相关的制备 HPLC 方案, 纯化落在区内的化合物。

- 5 分析 HPLC 和 TLC 都优选在步骤 a 中进行。有代表性的样品在纯化所有或基本上所有的库前, 优选通过制备 HPLC 进行纯化。有代表性的样品进行纯化后, 优选测定样品中化合物的纯度。它提供了用于检查该方法迅速有效的方法, 以保证有效工作。

测定纯度后, 可以任选对库中 10-100%, 优选 50-100% 化合物进行
10 TLC 分析, 在与步骤 a 中进行 TLC 相同或基本上相同的条件下进行。这证明了用于有代表性的样品, 并用于整个库的条件。

通过检查有代表性样品的纯度和对库中大部分化合物进行 TLC, 可以证明该技术足以纯化化合物, 该条件可广泛用于整个库。如果不能获得期望的纯度, 和/或如果有代表性的样品和 10-100% 库的 TLC 显示
15 化合物移动到同一区, 那么需要用可选的制备 HPLC 方案进行测定。在某些场合, 可以对库中的一部分应用不同的方案。

在所有或基本上所有的库的制备 HPLC 中, 通过应用紫外和/或 MS 检测器测定样品中所需化合物的存在 (从制备 HPLC 洗脱出来), 优选对组分进行收集。

20 在一个实施方案中, 化合物库的纯化通过

a) 通过 TLC 或分析 HPLC 测定化合物库中的化合物或化合物中有代表性的样品的 R_f 或保留时间,

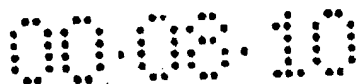
b) 将 R_f 或保留时间与具有一组参数的一组制备 HPLC 条件相关, 其中是与用于 TLC 或分析 HPLC 的条件相关, 和

25 c) 对库中的一个化合物或多个化合物进行制备或半制备 HPLC, 其中

1) 从制备或半制备 HPLC 柱中得到的洗脱液一部分通过紫外检测器检测, 另一部分通过质谱检测器检测;

2) 丢弃洗脱液, 直到紫外或质谱检测器显示洗脱出所需的化合物,

30 3) 通过质谱检测器测定含有所需的化合物的样品,



- 4) 收集含有所需的化合物的样品;
- 5) 用适当的溶剂洗柱, 使从柱中除去任何杂质;
- 6) 再平衡柱, 和
- 7) 对每个化合物重复必要的步骤, 进行纯化和/或鉴定。

5 该方法允许同时收集紫外吸收或质谱数据。通过质谱检测器收集的组分具有几种与之相关的风险, 包括由于分子质量的计算错误损失期望的化合物, 形成加合物, 和损失在该使用条件下未离子化的化合物。另一方面, 通过质谱检测器收集组分的优点在于只收集少量组分。通过紫外和质谱检测器合用收集组分, 可以获得通过质谱检测器收集组分的有利方面, 而避免其不利方面。但是, 这样做的困难是很难通过 UV 收集
10 组分, 和使用高流速梯度。为了保证可靠分离洗脱液至 MS 和组分收集器, 在供液泵 (在线稀释泵, 其在第二次分离前稀释进入质谱检测器的洗脱液) 和探针之间的在线压力, 必须低于后柱进口和组分收集器之间的在线压力。为了获得满意的压力, 可以改变标准 HPLC 装置对管的要求,
15 提供更宽的管以处理增加的流速, 任选使用 UV/DAD (二极管阵列检测器) 或其它适合进行组分收集的检测器。

 可以任选进行下列步骤。收集的化合物信息 (即紫外吸收和 MS 信息) 可以储存在相关的数据库中, 数据库中还可包括关于化合物的其它信息 (即合成条件、生物检测信息、产量等)。可以进一步鉴别化合物,
20 例如, 通过 ^1H NMR。为了更快地评价化合物的纯度, HPLC 可以包括两个或更多的柱, 其中的一个用于测定化合物的 Log P 值, 而另一个清洗和再生。该步骤消除了色谱平衡等待时间。

可以应用该方法评价的化合物的类型

25 应用本文描述的方法, 可以测定能从 HPLC 柱洗脱的任何有机化合物的 Log P 值和纯度。该化合物优选为一个化合物库的一部分, 更优选为引导产生的或组合化合物库。应用该方法获得的纯度通常大于 90%, 优选大于 95%。

 术语“库”指至少 3 个, 优选为 10^2 - 10^3 , 更优选为 10^2 - 10^4 化合物。
30 优选这些化合物是在一个易于合成它们的单一溶液中或反应混合物中制

备的多种化合物。库中的每个化合物可以是分离的，或任选已被鉴定。

一般情况下，化合物具有一个核心结构，其中在至少一个位置，优选两个或更多的位置上被多种不同的官能团进行修饰，以产生一个库，例如，组合的或引导优化 (lead optimization) 的化合物库。

- 5 典型的的核心结构为直链的、支链的或环状有机化合物，其包括至少 3 个碳原子，并且至少 1 个，优选至少 2 个部位能够进行反应以改变结构，通常通过将其它分子加入到反应部位来进行。

杀虫剂族的例子包括 1-芳基吡唑、吡咯、吡咯烷酮和烟酸衍生物。然而，可以结合到适当结合部位的配位体化合物可以为，例如，甾类、
10 激素、肽、蛋白质、低聚核苷酸、寡核糖核苷酸、酶等。

适合的核心结构包括，但不限于肽、蛋白质、低聚核苷酸、寡核糖核苷酸、低聚糖、生物碱、喹啉、异喹啉、苯并咪唑、苯并噻唑、嘌呤、嘧啶、四氢噻唑、咪唑并吡嗪酮、呋唑并吡啶、吡咯、吡咯烷、咪唑酮、
15 guinolone、氨基酸、大环内酯物、penems、糖类、叶黄素、苯丙噻二嗪、anthracycline、二苯并环庚二烯、肌糖、卟啉、咕啉、和碳骨架存在的几何体 (例如，十二面体)。核心结构可以来源于天然存在的化合物，或者可以包括非天然修饰物 (即，非天然存在的氨基酸和核苷。

适合的核心结构修饰物包括：

- 1) 氨基酸衍生物，其中包括，例如，天然的和合成的氨基酸残
20 基，其中包括所有天然存在的 α 氨基酸，具有衍生物的种类，天然存在的侧链的变异体或类似物；N-取代的甘氨酸残基；已知的在功能上类似氨基酸残基的天然的和合成的种类，如抑制素、苯丁抑制素等。

- 2) 核苷酸衍生物，其中包括天然的和合成的核苷酸，如腺苷、胸腺嘧啶，胍，尿苷，胞核嘧啶，它们的衍生物和嘌呤环的变异体和类
25 似物，糖环，磷酸键和它们中的一些或全部的组合。核苷酸探针 (2-25 个核苷酸之间) 和低聚核苷酸 (超过 25 个核苷酸) 包括所有各种可能的结构修饰；天然存在的核苷酸的同型和异型合成的排列和组合；含有合成的嘌呤或嘧啶类的衍生物和变异体，或它们的类似物；各种糖环类似物；多种可选的骨架类似物，包括但不限于磷酸二酯、硫逐磷酸酯、
30 二硫逐磷酸酯、氨基磷酸酯、烷基磷酸三酯、氨基磺酸盐、3'-硫醛乙缩

醛 (thioformacetal), 亚甲基 (亚氨基), 3-N-氨基甲酸盐, 吗啉代氨基甲酸盐和肽核酸类似物。

- 3) 碳水化合物的衍生物, 其包括天然生理活性的碳水化合物; 相关化合物, 如葡萄糖、半乳糖、唾液酸、 β -D-葡萄糖胺和 nojirimycin, 其均为葡萄糖苷酶抑制剂; 伪糖, 如 5a-carba-2-D-吡喃半乳糖, 已知其抑制肺炎克雷白杆菌的生长 ($n=1$); 合成的碳水化合物残基和它们的衍生物 ($n=1$), 并且它们的所有的复合寡聚排列均发现于自然界中, 包括高甘露糖低聚糖, 已知的抗生素链霉素 ($n>1$)。

- 4) 天然存在的或合成有机结构基序, 术语“基序”被定义为具有或含有生物活性的特定结构的有机分子, 如对酶活性部位具有互补结构的分子。该术语包括任何已知的药物化合物的基本结构, 包括药效基团或它们的代谢物。该基本结构包括 β -内酰胺, 如青霉素, 已知其抑制细菌细胞壁生物合成; 二苯并氮卓, 已知其与 CNS 受体结合, 用作抗抑郁药; 多聚乙酰大环内酯物, 已知其与细菌核糖体酶结合。这些结构基序已知具有特异性的所需的与配体受体结合的性能。

- 5) 报告元件, 如能够光放大的天然或合成的染料或残基, 其具有可反应基团, 可以在合成中结合到氮磺酰亚胺结构或反应程式中, 可以通过这些基团附着, 而干扰或影响基团的指示功能。优选的反应基团为氨, 硫, 羟基, 羧酸, 羧酸酯, 特别是甲基酯, 酰基氯, 异氰酸盐, 烷基卤化物, 芳基卤化物, 和环氧乙烷基团。

- 6) 含有可聚合基团的有机部分, 如双键, 或能够进行聚合或共聚的其它官能团。适合的基团包括乙烯基, 环氧乙烷基, 羧酸, 酰基氯, 酯, 酰胺, 二氢唑酮, 内酯和内酰胺, 还可以使用那些被定义为 R 和 R' 的其它有机部分。

- 7) 大分子成分, 如通过上面归纳的各种反应基团可以附着到氮磺酰亚胺结构上的大分子表面或结构, 其结合方式使这种相连的种类与配体-受体分子的接合不产生负面影响, 并且该连接的功能团的相互作用活性由该大分子确定或限制。大分子成分的例子包括多孔的和非多孔的无机成分, 例如, 二氧化硅, 氧化铝, 氧化锆, 二氧化钛等, 其通常用于不同方面, 如普通或反相色谱分离, 水纯化, 用于着色的颜料等; 多



孔的和非多孔的有机大分子成分，包括合成成分，如苯乙烯丁二烯苯小珠，各种甲基丙烯酸酯小珠，PVA 小珠等，其通常用于蛋白质纯化，水软化，和多种其它的应用；天然成分如天然的功能化的纤维素，如，例如，琼脂糖和壳质，由尼龙制成的薄片和中空纤维膜，聚醚砜，或任何上面提到的材料。这些大分子的分子量范围可以直到大约 2000 道尔顿。

适合的化学修饰物还包括化学键合到适当的有机部分，放射性部分，氢原子，含有适当的亲电子基团的有机部分，如醛，酯，烷基卤化物，酮，腈，环氧化物等；适合的亲核基团，如羟基，氨，羧酸盐，酰胺，负碳离子，尿素等；或其中一个下面定义的其它结构成分。另外，化学修饰物可以以环、双环或三环系统的形式；或连接到上述分子式定义的化合物重复单元末端的结构；或可以分别连接到其它部分上。

这种修饰可以相同或不同，每个可以含有一个或更多的碳、氮、硫、氧原子，任何无机元素，或它们的组合。例如，核心结构可以用氰基、氮、卤素、氧、羟基、烷氧基、硫、直链或支链烷基、碳环芳基，和它们的取代或杂环衍生物。修饰可以是在不同的相邻的分子核中，对于它们附着的碳原子具有选择的立体化学排列。

化合物可以逻辑化的方式在多管排列(array)或多孔板，以化学化合物排列的形式合成。优选地，化合物都具有中心核结构，具有各种修饰，其可以进行结构-活性关系的鉴别，用其确定用于特定应用的最佳化合物。

排列的安排方式应可加快合成、纯化和评价，以从测试获得最大的信息内容，并便于迅速评价这些数据。

排列可以从逻辑排列的化合物的亚排列来建立。可以制备这样一种亚排列，这种亚排列包括结构相关的单个化学化合物的可空间寻址的组，这些化合物具有共同的结构和可变的修饰。当结构中多个位置被修饰时，亚排列特别有用，在给定亚排列中的任何两个化合物之间的变化可以包括，例如，结构中 0 个或 1 个改变。

这些亚排列和排列可以被组织形成更高次序的排列，其包括多组排列，可以被作为更高次序的排列评价，以提供关于感兴趣的共同核结构

的最佳结构特征的信息。

这种亚排列的安排方式应可通过直接比较化合物自动产生有关已知的片段在所期望的应用中所具有的效果的信息，以及对物理和反应性质的影响的信息。按照简单群组理论 (simple set theory)，对于任何数量的
5 独立可变结构多样性元素 (independently variable structural diversity elements) n ，存在 n 个逻辑高阶排列，这样通过从适当排列的亚排列中相关地址的测试数据的比较，可以以类似的方式获得每个 n 结构多样性元素变化的效果的关系信息。

通过筛选核分子的所有可能合成变化，最佳候选者的选择与选择化
10 合物的“合理”基础相比，更应该说是数据收集方法的函数。可以迅速优化期望的物理和化学性质，即结合亲和性与生物活性，直接在特定的排列或亚排列内与结构的改变相关。

因为已知每个化合物在多管架的空间地址，可以测试排列以产生完全的相关结构信息，因此一个正结果提供：(1) 关于在任何给定空间地
15 址的化合物的信息；(2) 在一组系统结构同种物上同时并列这一信息；
(3) 在存在正结果的负结果中提取相关结构信息的能力。

纯化优选通过计算机控制进行，其中多管排列中每个管或多孔板中每个孔的位置储存在计算机中，要合成的化合物的身份被储存在计算机中的“记忆图”中，或储存在将化合物的数据与管或孔的位置相关的其
20 它的装置中。或者，可以人工进行纯化，优选在多管架或多孔盘内进行，信息储存在计算机中。可以纯化和/或鉴别管中的化合物。

参照下列非限定性的实施例，可以进一步理解本发明。

实施例 1：分析方法

25 一系列的化合物通过 C18 TLC 板进行评价，应用 80/20 v/v 的甲醇/水溶剂系统。发现化合物具有四个保留因子范围(R_f s)， $R_f=0$ ， $0.05<R_f<0.2$ ， $0.2<R_f<0.8$ ，或 $R_f>0.8$ 。

那些 $R_f=0$ 的化合物应用内径为 0.46 mm 的 5 微米 50 mm C18 反相 HPLC 柱进行洗脱。化合物通过两个溶剂系统 (溶剂 A 水/乙腈 98/1.5
30 (v/v)，和溶剂 B 100% 甲醇) 的不同梯度进行洗脱。

Rf 在 0.2 和 0.8 之间的化合物用如下的方案 I 或 II 进行洗脱。Rf 在 0.05 和 0.2 之间的化合物用如下的方案 II 或 III 进行洗脱。Rf 大于 0.8 的化合物用如下的方案 I 或 IV 进行洗脱。方案如下表所列。

5

表 1

方案 I (分析)

时间 (分)	流速 (mL/min)	% A	% B
0.0	1.5	75	25
5.0	1.5	5	95
6.0	1.5	0	100
8.0	1.8	75	25

10

表 2

方案 II (分析)

时间 (分)	流速 (mL/min)	% A	% B
0.0	1.5	45	55
5.0	1.5	0	100
6.0	1.5	0	100
8.0	1.8	45	55

表 3

方案 III (分析)

时间 (分)	流速 (mL/min)	% A	% B
0.0	1.5	30	70
5.0	1.5	0	100
6.0	1.5	0	100
8.0	1.8	30	70

15

00.08.10

表 4

方案IV (分析)

时间 (分)	流速 (mL/min)	% A	% B
0.0	1.5	95	5
5.0	1.5	5	95
6.0	1.5	0	100
8.0	1.8	95	5

分析柱的四个方案可以按比例放大至制备 HPLC 柱 (内径 50 X 20,
5 吸附剂粒径为 5 微米或更少) 的四个方案, 如下表 5-8 所示。

表 5

方案 I (制备)

时间 (分)	流速 (mL/min)	% A	% B
0.0	28.0	90	10
5.0	28.0	75	25
6.0	30.0	5	95
7.0	25.0	0	100
9.0	25.0	90	10

10

表 6

方案 II (制备)

时间 (分)	流速 (mL/min)	% A	% B
0.0	15	70	30
1.0	28	45	55
6.0	28	0	100
7.0	28	0	100
9.0	30.0	70	30

00.08.10

表 7

方案III (制备)

时间 (分)	流速 (mL/min)	% A	% B
0.0	15.0	45	55
1.0	28.0	30	70
6.0	28.0	0	100
7.0	28.0	0	100
9.0	30.0	45	55

表 8

方案IV (制备)

时间 (分)	流速 (mL/min)	% A	% B
0.0	15.0	98	2
1.0	28.0	95	5
6.0	28.0	5	95
7.0	28.0	0	100
9.0	30.0	98	2

在该实施例中, 自动注射器为具有 819 注射阀动器的 Gilson 215 液体处理器。组分收集器为 Gilson 215 液体处理器。梯度泵为具有 50 SC 泵头的两个 Gilson 306 型泵。稀释泵为具有 1.5 SC 泵头的 Gilson 307 型泵。平衡为具有 50 SC 泵头的可编程 HPLC Gilson 305 型泵。混合器为 806 型等轴 Gilson 811C 动力混合器。压力调节器为 Gilson 806 型压力调节器。使用的 HPLC 检测器为 Gilson 170 型二极管阵列检测器(micromass 的 MS 检测器平台 LC 型)。MS 检测器包括一个四倍质量分析器, 其具有空气压力电离 (API) 源, 可以用于空气化学电离 (APCI) 和 Megaflow 电喷射 (electrospray) 电离探针。质谱检测器配备有一个旋转泵和转换器。开关阀门为两个 Gilson 配对阀门和一个 10 port Rheodyne 开关阀门。分流器为一个由 LC 填充的 1/1000 ACURATE 和 Upchurch 分流器。数据收集系统为 Digital CELEB GL-2 计算机, 监测器和 Hewlett Packard Jet 6P

打印机, 其包括在 Windows NT V.4.0 下工作的 micromass Masslynx NT 3.1B6, Openlynx Version™, FaractionLynx™ 和 Gilson 的 Upipoint v. 1.64 软件。

自动制备-HPLC/UV/MS 的装配如图 1 所示。

5 系统的管尺寸如下:

从混合器到注射器, 从注射器到柱, 从柱到 UV 二极管阵列检测器, 和从 UV 到分流箱为 Green Peek, Upchurch Scientific, INC 0.03"ID。从制备泵到分流箱为 Green Peek, Upchurch Scientific, INC 0.01"ID。从分流箱到 Upchurch 分流器为 Green Peek, Upchurch Scientific, INC 0.07"ID。从
10 Upchurch 分流器到水储库为 Green Peek, Upchurch Scientific, INC 0.01"ID。从分流器到组分收集器为 0.04"ID (Tubing Accurate/FC 目录编号 PE-1000 FC)。

在下面描述的纯化方法中, 管尺寸允许使用 30 mL/min 的流速和相对小的吸附剂粒径 (5 微米或更少)。传统 HPLCs 通常使用更小尺寸的
15 管, 这样获得这样高的流速就特别困难, 因此, 进行纯化方法就特别困难。

图 1 显示了在 HPLC 运行中样品分离的路径。注射后, 从梯度泵的溶剂分离柱 A 的成分, 而柱 B 通过再平衡泵进行再平衡。10 port Rheodyne 开关阀门控制该过程。分离的组分进入二极管阵列检测器, 然后进入分
20 流箱。在分流箱中, 以 1/1000 的比例分离。只有一部分进入 MS; 其余进入废液储库, 通过 UV 或 MS 检测到所需的化合物后, 组分收集器开始收集样品。进入到 MS 的部分通过稀释泵稀释, 电喷射 (electrospray) (ESP) 电离探针流速为 1.5 mL/min。然后, 稀释液通过二次分流器 (Upchurch 分流器) 再次进行分流, 只有大约 300 μ L 进入 ESP 探针,
25 其余运送至废液中。二次分流器不需要空气压力化学电离 (APCI) 探针。应用 Unipoint 软件控制梯度泵。

MS 发现峰的延迟时间, 峰到达组分收集器的延迟时间, 以及 UV 检测器与 MS 之间的延迟时间, 应用香豆素作为标准物进行测定, 应用甲醇/水 (50/50) 流动相, 如表 9 所示。

表 9

探针	梯度流速 (mL/min)	制备流速 (mL/min)	时间延迟 (秒) MS-FC	时间延迟 (秒) UV-MS
ESP	22	1.5	20	3.5
	28	1.5	15	9
	30	1.5	15	9
APCI	22	0.5	12	23
	28	0.5	15	12
	30	0.5	15	12

在延迟时间测定前, 质谱检测器用 PEG 200 至 PEG 1000 校准质量标度。质谱检测器用不同流速的两个探针进行转换。

- 5 大量的化合物应用本文描述的方法通过 HPLC 柱。化合物的分子量范围在 100-650 g/mol 之间, 样品量在 0.1-200 mg 之间, 注射体积范围在 50-2000 微升之间。

下面的实施例说明了高效率纯化方法的应用。

10 实施例 2: 一个小化合物库的纯化

选择一个专利化合物库, 应用 80/20 甲醇/水作为洗脱剂, 得到 5 个化合物的 TLC 图谱, TLC 图谱如图 2 所示。

- 计算 TLC 的 R_f s 大约为 0.11, 与预先限定的 HPLC 方法 (实施例 I 中的方法 II 或 III) 进行相关。分别评价方法 II 和 III, 测定哪一种可提供
15 更好的分离。色谱图表明方法 II 能更好地从杂质中纯化化合物。

在制备 HPLC 柱上纯化所需的化合物, 注射体积为 2 mL, 浓度为 150 mg 化合物/2 mL DMF。化合物在制备 HPLC 柱上的保留时间在 3-3.5 分之间。

- 在化合物中有代表性的样品纯化后, 对整个库进行 TLC。TLC 表明
20 所有所需的化合物洗脱大致相同的 R_f 值 (大约 0.01)。

将制备 HPLC 方法应用到库中的所有 450 个化合物, 获得的平均纯

00:08:10

度为 91%，平均产量为 28 mg。大于 85%的化合物的纯度大于 95%。

本领域技术人员应用常规的实验，可以发现或确定许多与本文描述的本发明具体实施方案相等价的方法。这些等价的方法包括在下面权利要求的范围内。

00.08.10

说明书附图

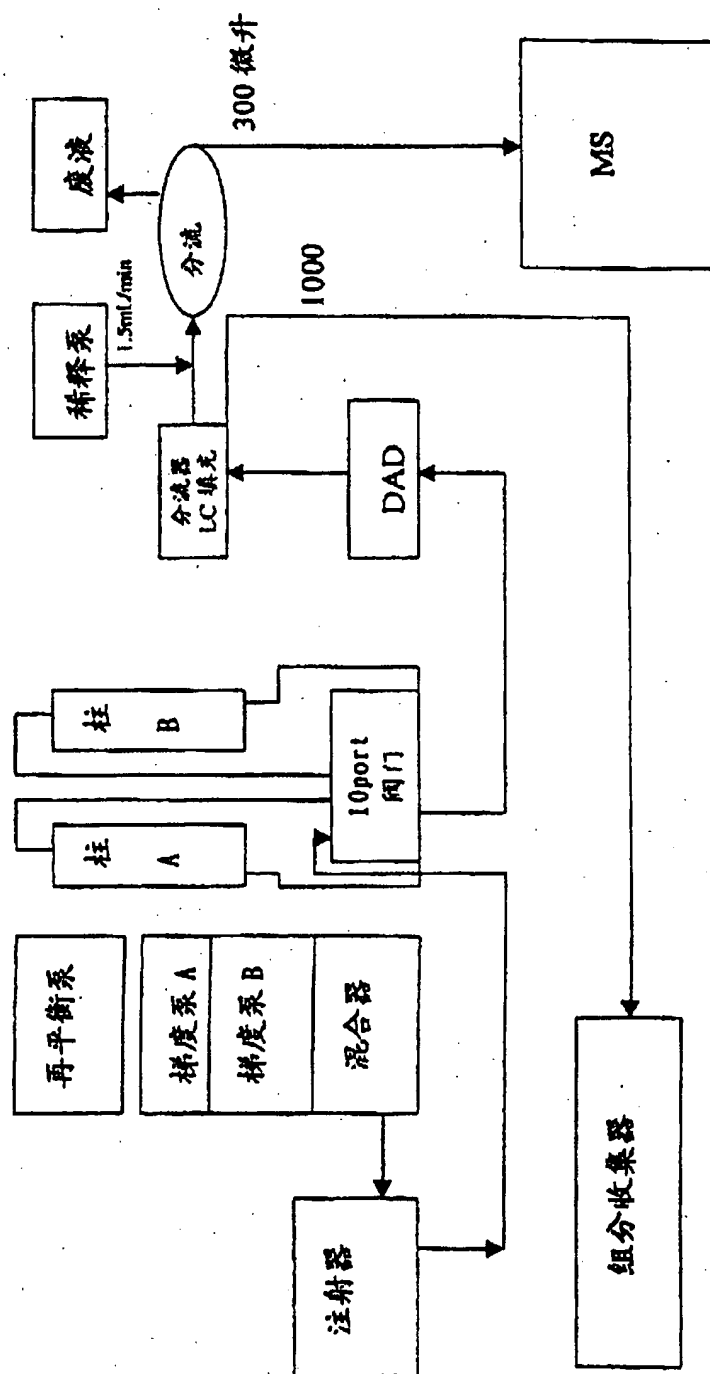


图 1

00.08.10



专利化合物的

图 2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.